

侯真真,张华伟,郝根喜,等.猪伪狂犬病病毒变异株传代致弱JS18-150株的获得与鉴定[J].华中农业大学学报,2024,43(5):178-185.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.05.020

猪伪狂犬病病毒变异株传代致弱JS18-150株的获得与鉴定

侯真真,张华伟,郝根喜,罗修鑫,宋文博,周明光,陈焕春,徐高原

武汉科前生物股份有限公司,武汉 430206

摘要 为获得安全性良好、免疫原性高的变异株弱毒苗,采用鸡胚成纤维细胞(CEF)传代培养的方法对猪伪狂犬病病毒流行毒株JS18株进行传代,最终获得JS18-150株,随后通过PCR鉴定、测序、致病力试验和免疫效力试验对JS18-150株的体外生长特性、安全性和免疫原性进行初步研究。试验结果显示,在CEF上连续传代后,JS18株的gI、gE、US9基因缺失,获得的JS18-150株毒力已致弱,在CEF上适应性显著提高,与JS18株生长动力学相似;将JS18-150株以 $10^{7.0}$ TCID₅₀/mL接种仔猪,所有仔猪均未观察到任何临床症状,且体温均未超过40.5 °C;JS18-150株以 10^6 TCID₅₀/mL接种仔猪后能保护仔猪有效抵御JS18株和HBZL05株的攻击。结果表明,JS18-150株对仔猪安全性良好,可作为PRV弱毒疫苗研制的候选毒株。

关键词 猪伪狂犬病病毒;变异株;传代致弱;基因缺失;伪狂犬病疫苗

中图分类号 S852.651 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)05-0178-08

猪伪狂犬病(pseudorabies, PR)是一种急性传染病,以体温升高、精神萎靡、食欲不振等为主要特征^[1]。猪是该病毒的主要天然宿主、贮存者以及传播者^[2-4]。不同年龄段的猪均可感染,主要临床症状为妊娠母猪流产、死胎、木乃伊胎,哺乳仔猪死亡率高^[5]。PR是伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起,PRV为线状双联DNA,基因组大小约为145 kb^[6]。在PRV中共发现16种膜蛋白,包括gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gK、gM、gL和gN等。其中gE基因是伪狂犬病病毒的主要毒力基因之一,能够诱导细胞融合,加快病毒在细胞之间的传递过程。还能够促进病毒在宿主中枢神经中传播,与gI蛋白形成gE/gI复合体,从而作为一个功能单位发挥作用^[7]。gE/gI蛋白复合体能与gC蛋白共同介导病毒在细胞中的释放^[8]。

为了彻底净化伪狂犬病,世界各国都开始进行伪狂犬病疫苗的研发。目前已研制出基因缺失疫苗、弱毒疫苗、重组伪狂犬病毒载体疫苗、亚单位疫苗^[9]。基因缺失疫苗因具有稳定、毒力不易返强、免疫原性强、保护时间长、区别免疫动物与自然感染动

物等特点^[10],在临幊上应用最多。其中最具有代表性的疫苗毒株有Bartha株、Bucharest株和TK200株^[11-12]。虽然疫苗株研制方法不同,但其主要毒力基因gE均有缺失,以此可更好地区分疫苗免疫猪和野毒感染猪。gE基因缺失疫苗的广泛应用使该病得到有效控制和消灭成为可能。

20世纪70年代,伪狂犬病活疫苗Bartha-K61株从匈牙利引入我国,用于猪伪狂犬病的防控,并得到很好的控制。但自2011年以来,使用Bartha-K61株疫苗免疫过的猪场再次暴发猪伪狂犬病,表现为母猪流产、死胎,仔猪高死亡率,通过分离毒株确认其与经典毒株不同,说明伪狂犬病病毒在我国已发生变异^[13]。随后全国各地均报道分离到伪狂犬病病毒的新型野毒株,表明传统疫苗株已不能产生足够的保护力,需要研制出针对变异株的新型疫苗^[14-18]。本研究以变异毒株JS18株为基础,经鸡胚成纤维细胞连续传代获得安全性良好、免疫原性高的JS18-150株,研究JS18-150株作为伪狂犬病病毒疫苗候选株的安全性和免疫效果,旨在为预防变异伪狂犬病的流行提供参考。

收稿日期:2023-10-24

基金项目:湖北省重点研发计划项目(2023BBB177)

侯真真,E-mail:2265446230@qq.com

通信作者:徐高原,E-mail:xugaoyuan@163.com

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

猪伪狂犬病病毒JS株由武汉科前生物股份有限公司在江西某猪场病料分离、鉴定、保管和供应;鸡胚成纤维细胞(chicken embryo fibroblasts, CEF),由SPF鸡胚制备而成,SPF鸡胚购自济南赛斯;猪睾丸细胞(ST细胞)购自美国标准菌种收藏中心;DMEM、2×DMEM培养基购自Gibco;低熔点琼脂糖购自bioshap;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自金源康;猪伪狂犬病病毒gB(PRV gB)抗体ELISA检测试剂盒购自BioCheck;猪伪狂犬病病毒gE抗体检测试剂盒购自IDEXX;21日龄伪狂犬病阴性仔猪购自湖北三湖畜牧有限公司。

1.2 试验组设计

选取15头猪伪狂犬病阴性的21日龄仔猪(gB-ELISA抗体和gE-ELISA抗体均为阴性),随机分为3组,隔离饲养。JS18株感染组试验猪每头颈部肌肉接种10头份JS18株($10^{6.0}$ TCID₅₀/头份);PRV JS18-150株免疫组试验猪每头颈部肌肉接种10头份JS18-150株($10^{6.0}$ TCID₅₀/头份);另取伪狂犬病阴性猪5头不做任何处理作为空白对照组。

1.3 鸡胚成纤维细胞的培养

选取9~10日龄发育良好的SPF鸡胚,先用碘酒消毒蛋壳气室部位,再用酒精棉球脱碘,同时在平皿中加入适量Hank's液,用镊子在气室中间破壳,去气

室蛋壳、气室膜,从胎儿眼睛位置下镊子,轻夹颈部挑出胎儿,快速放入平皿中。将鸡胚去头、四肢和内脏,把胚体转入烧杯中,以挑剪方式把胚体剪至小米粒大小后,转移至适宜大小的锥形瓶中,Hank's液清洗3次。加入0.25%胰酶后快速加盖转入37℃水浴锅中消化,将胰酶轻轻倒出,清洗组织3次,加入含10%血清乳汉液,吹打组织、静置、过滤,反复吹打7轮直至仅剩骨头渣。悬液过滤后加入细胞瓶,贴壁过夜,得到鸡胚成纤维细胞。

1.4 猪伪狂犬病病毒JS18株的传代培养

取猪伪狂犬病病毒JS18株0.1 mL接种CEF细胞中,置37℃含5% CO₂的细胞培养箱中继续培养,当细胞病变达到90%以上时,收获上清液和细胞混合物得到JS18-2株。按上述方法将猪伪狂犬病病毒JS18株在CEF细胞上连续传代至100代。从第100代连续5代挑取单个蚀斑,继续传代至第150代得JS18-150株。注意观察细胞病变出现的时间、病变率以及细胞病变的形态变化。

1.5 不同代次毒株的全基因组扩增与测序

以GenBank中PRV全基因组序列(KP257591.1)作为参考,设计并合成gD/US2基因鉴定引物(表1)。分别提取猪伪狂犬病病毒JS18株第1代、第50代、第100代、第130代和第150代病毒基因组,利用特异性引物扩增目的基因,鉴定不同代次毒种序列的稳定性。对特异性条带进行胶回收,连接至pEASY-T1载体,构建成功后送至上海生工测序。

表1 PCR引物

Table 1 Primers used for PCR

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	大小/bp Size	
		JS18	JS18-150
gD/US2-F	GTCGAGACCGAGACCACCAACACCACCCAGACGGGCCTGT		
gD/US2-R	TCACGATCTGGGCATGCAGGGCCTCCGTCCACTCGCCGGCGCCA	5 837	2 629

1.6 体外生长曲线的绘制

取猪伪狂犬病病毒JS18株和JS18-150株分别以0.01 MOI接种于单层CEF细胞,分别在接种后12、24、36、48、60、72 h取样,测定各时间点的TCID₅₀。

1.7 猪伪狂犬病病毒JS18-150株对仔猪的安全性试验

将JS18株和JS18-150株分别经颈部肌肉接种伪狂犬病阴性猪各5头,1.0 mL/头,病毒含量为 $1.0 \times 10^{7.0}$ TCID₅₀/mL,另取伪狂犬病阴性猪5头作为空白对照组。连续观察14 d,观察疫苗接种猪精

神、食欲以及临床表现;与接种前相比,体温是否有升高现象。接种后21 d采血,分别使用gB-ELISA和gE-ELISA检测伪狂犬病病毒gB和gE抗体。

1.8 猪伪狂犬病病毒JS18-150株对仔猪免疫力试验

选取20头伪狂犬病阴性的21日龄仔猪(gB-ELISA抗体和gE-ELISA抗体均为阴性),随机分4组,隔离饲养。A、C组肌注1头份JS18-150株($10^{6.0}$ TCID₅₀/头份),B、D组肌注1 mL DMEM。免疫后每7 d进行1次前腔静脉采血(至攻毒后14 d),检测gB-ELISA抗体水平。免疫后28 d,连同对照组

仔猪采血分离血清,检测血清中的中和抗体。同时A、B组使用PRV野毒JS18毒株滴鼻攻毒,攻毒剂量为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/头份;C、D组使用PRV HBZL05毒株滴鼻攻毒,攻毒剂量为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/头份。攻毒后观察21 d,测量体温,记录症状,统计发病率和死亡率。对试验猪进行解剖,观察脑、扁桃体病变,并取样进行组织病理学观察。

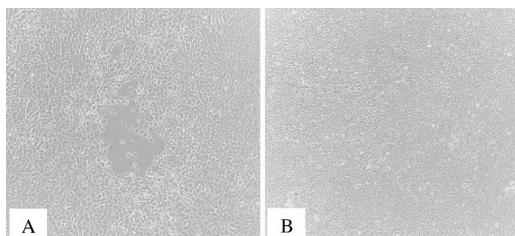
1.9 数据统计分析

所有数据分析均采用GraphPad Prism8.0软件进行:使用t检验进行两组间差异评估, $P>0.05$ (ns)表示差异不显著、 $P<0.05$ (*)表示差异显著、 $P<0.01$ (**)表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 CEF细胞中猪伪狂犬病病毒的分离培养结果

将猪伪狂犬病病毒JS株接种到CEF细胞,置37℃含5%CO₂的细胞培养箱中培养3~5 d。每日观察细胞病变,待细胞病变达80%收取细胞上清。将所得病毒株命名为猪伪狂犬病病毒JS18株(图1)。



A:JS18株;B:细胞对照。A: JS18; B: CEF cultured as control.

图1 猪伪狂犬病病毒JS18株在CEF上的病变结果

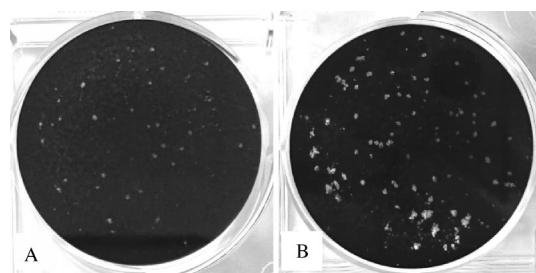
Fig. 1 CPE caused by PRV JS18 in CEF

2.2 猪伪狂犬病病毒JS18-150株在CEF细胞中的增殖特性

分离得到的野毒株JS18株在CEF细胞上传代至150代,获得高代次毒株JS18-150株。JS18-150株在体外传代适应性明显提升,表现为相同接种剂量下,JS18-150株感染细胞后形成病变时间缩短,细胞病变面积增大,且单位面积内噬斑数明显多于JS18株(图2)。

2.3 PCR鉴定与序列测定结果

分别以猪伪狂犬病病毒JS18株第1代、第50代、第100代、第130代和第150代病毒基因组为模板,以gD/US2引物进行扩增。PCR结果第1代和第50代毒株扩增产物大小为5 837 bp,第100代后扩增产物大小为2 629 bp。测序结果显示第50代与第1代同



A: JS18. B: JS18-150.

图2 JS18株和JS18-150株在CEF上的噬斑结果

Fig. 2 Plaque morphology of PRV JS18 and JS18-150 in CEF

源性为100%,ORF大小均为5 837 bp。第100代、第130代和第150代该毒株均缺失3 208 bp碱基(从gI基因第269位核苷酸至US9基因,包括gI部分基因、gE全部基因和US9全部基因);同时gD基因第906位碱基发生点突变。结果表明,gI/US2基因缺失部位稳定,未发生恢复。

2.4 不同代次毒株的滴度测定结果

将猪伪狂犬病病毒JS18株和JS18-150株分别以0.01 MOI接种单层CEF细胞,接毒后不同时间点收集,反复冻融3次后,对各时间点收集的样品进行毒价测定。结果显示:在CEF细胞上PRV JS18株和JS18-150株的生长趋势基本相同,感染36 h后,病毒滴度均达到顶峰,随后缓慢下降(图3)。在整个增殖过程中,相同接种时间JS18株病毒滴度略低于JS18-150株。

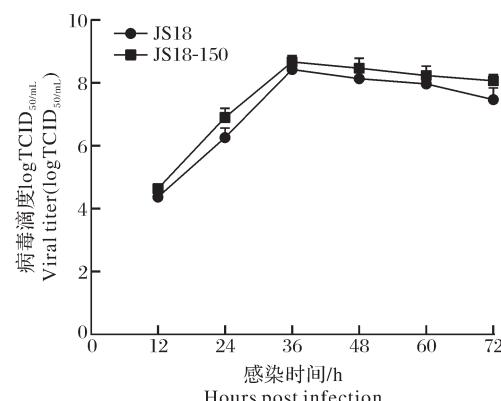


图3 猪伪狂犬病病毒JS18株和JS18-150株的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of PRV JS18 and JS18-150

2.5 猪伪狂犬病病毒JS18-150株对仔猪的安全性

将JS18株和JS18-150株接种仔猪后,JS18株感染组5/5仔猪出现精神不振、呼吸困难和食欲减退等临床症状,同时仔猪全部死亡(图4)。JS18-150株和空白对照组所有仔猪均未观察到任何临床症状,且

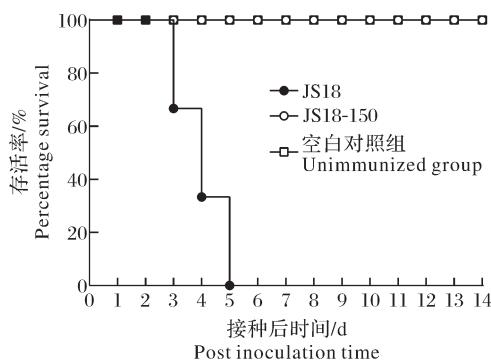


图4 仔猪接种不同代次猪伪狂犬病病毒后的存活率
Fig.4 Survival rates of piglets infected with different passages of PRV

体温正常,均未超过40.5℃。观察期间PRV JS18株感染组试验猪gB和gE抗体均为阳性;PRV JS18-150株免疫组试验猪gB抗体均为阳性,而gE抗体均为阴性。

空白对照组gB和gE抗体均为阴性(表2~表3)。结果表明,JS18-150株毒力显著下降,对仔猪具有良好的安全性。

表2 仔猪接种不同代次猪伪狂犬病病毒后

PRV gB和gE抗体检测结果

Table 2 PRV gB and gE-specific antibody in piglets inoculated with different passaged PRV

分组 Groups	编号 No.	gB抗体(S/P值) gB-specific antibody (S/P value)	gE抗体(S/N值) gE-specific antibody(S/N value)
JS18	01	1.98	0.21
	02	1.74	0.09
	03	1.68	0.15
	04	1.59	0.17
	05	1.88	0.20
	06	1.96	0.97
JS18-150	07	1.57	0.86
	08	1.85	1.15
	09	1.69	0.90
	10	2.06	1.01
	11	0.36	0.89
空白对照组 The control group	12	0.43	1.07
	13	0.29	0.96
	14	0.39	0.82
	15	0.40	0.93

注:S/P≥0.500,样品gB抗体为阳性;S/P≤0.499,样品gB抗体为阴性;S/N≤0.60,样品gE抗体为阳性,S/N>0.7,样品gE抗体为阴性。Note: If S/P is≥0.500, the sample is positive for gB antibodies; if S/P is≤0.499, the sample is negative for gB antibodies; if S/N is≤0.60, the sample is positive for gE antibodies; if S/N is>0.7, the sample is negative for gE antibodies.

表3 JS18-150株对仔猪的安全性试验结果

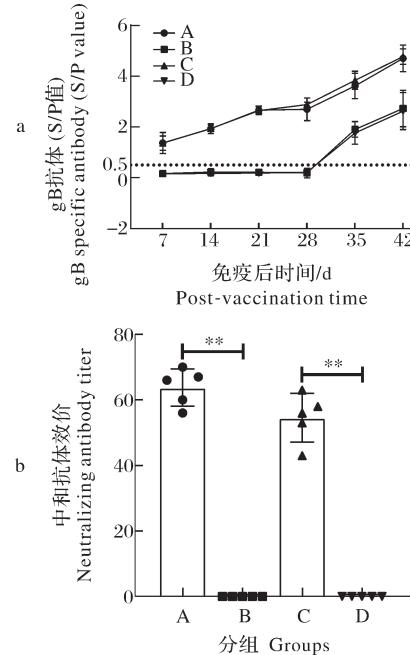
Table 3 Safety of piglets vaccinated with JS18-150

分组 Groups	接种剂量 Immunizing doses	临床症状+ Clinical symptoms	体温(≥40.5℃) Temperature	gB ⁺	gE ⁺
JS18	10 ^{7.0} TCID ₅₀ /mL	5/5	5/5	5/5	5/5
JS18-150		0/5	0/5	5/5	0/5
空白对照组 The control group	0	0/5	0/5	0/5	0/5

注:临床症状+:精神不振、呼吸困难和食欲减退等。X/Y:发病数/总数(或阳性数/总数)。下同。Note:Clinical symptoms+: depression, respiratory distress and anorexia. X/Y: Number of cases/total(or number of positives/total).The same as below.

2.6 猪伪狂犬病病毒JS18-150株对仔猪的免疫保护效果

A、C组免疫接种后试验猪精神、食欲正常,接种部位无异常;免疫后28 d免疫组仔猪产生较高的gB抗体水平,PRV中和抗体效价分别为(63.8±5.08)和(54.6±6.65)(图5a、5b)。B、D组攻毒后对照组出现



a:PRV gB特异性抗体水平;b:中和抗体水平. A:免疫组-JS18毒株;B:未免疫组-JS18毒株;C:免疫组-HBZL05毒株;D:未免疫组-HBZL05毒株。下同。a: The level of PRV gB-specific antibody. b: Neutralizing antibody titer. A: Inoculation with JS18-150 and challenged with JS18; B: Inoculation with DMEM and challenged with JS18; C: Inoculation with JS18-150 and challenged with HBZL05; D: Inoculation with DMEM and challenged with HBZL05. The same as below.

图5 JS18-150株对仔猪的免疫保护效果

Fig. 5 Protective efficacy of JS18-150 immunization

体温升高、精神沉郁、食欲废绝等典型症状，并在观察期间全部死亡；A、C组使用2种野生型PRV毒株攻毒均未死亡，获得100%保护（表4）。

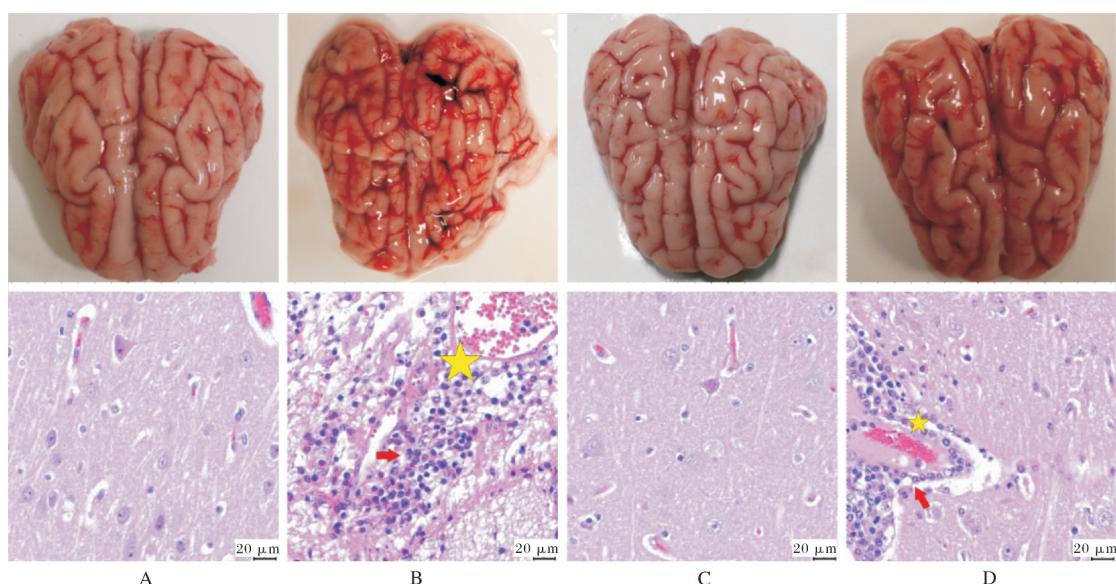
解剖结果发现，B、D组仔猪攻毒后，猪只脑出血，扁桃体化脓、出血，而A、C组猪只则无典型病变出现（图6~图7）。取各组的脑和扁桃体组织制备病理切片，可观察到B、D组脑组织脑膜、脉络膜、脑实质等血管周围淋巴细胞浸润，形成血管“袖套”；扁桃体淋巴细胞坏死，均质红染，吞噬细胞吞噬坏死细胞碎片，而A、C组猪只则未观察到典型病理变化（图

表4 JS18-150株对仔猪免疫保护的试验结果

Table 4 Protective efficacy of JS18-150 immunization

分组 Groups	攻毒毒株 Viral strain	临床症 状+ Clinical symptoms	体温(\geq 40.5 °C) Tempera- ture	发病 Morbidity	死亡 Death
A	JS18	0/5	0/5	0/5	0/5
B	JS18	5/5	5/5	5/5	5/5
C	HBZL05	0/5	0/5	0/5	0/5
D	HBZL05	5/5	5/5	5/5	5/5

6~图7)。以上结果说明JS18-150株作为疫苗接种仔猪能够产生良好的交叉保护。



→:淋巴细胞浸润；☆:血管“袖套”。→:Lymphocyte infiltration; ☆:Vascular cuff.

图6 攻毒后脑组织的剖检与镜检结果(400×)

Fig.6 Autopsy and microscopic examination of brain tissue after challenge(400×)

3 讨 论

猪伪狂犬病是由猪疱疹病毒引起的以发热、奇痒和脑脊髓炎为主要特征的急性传染病，该病严重制约养猪业的高质量发展。目前针对该病的防控，国内外均以疫苗免疫预防为主，结合配套的gE-ELISA抗体检测方法淘汰、净化野毒感染猪，从而实现伪狂犬病的净化。目前，临床应用的猪伪狂犬病疫苗可分为3类：一是经灭活加入佐剂制备的灭活疫苗；二是利用基因工程技术，使PRV的相关毒力基因无法表达，毒力致弱同时又保持较高免疫原性而制备的基因缺失疫苗；三是将分离得到的野毒株经异源细胞不断传代得到的自然传代弱毒疫苗^[19]。

目前已报道的伪狂犬病自然传代弱毒疫苗有Bartha株、布加勒斯特株和BUK株等。其中匈牙利

的Bartha株是将PRV强毒株在猪肾细胞、鸡胚上反复传代后获得的疫苗株^[20]。布加勒斯特株是用伪狂犬病病毒强毒株在鸡胚尿囊液培养后，再用鸡胚培养得到的疫苗株^[21]。BUK株是通过鸡胚和鸡胚成纤维细胞传代获得的疫苗株^[21]。该类疫苗由于自然基因缺失、免疫原性优良、生产工艺简便可行等特点，在控制和净化猪伪狂犬病的流行中起到重要作用。

本研究将野毒株JS18株经鸡胚成纤维细胞连续传代获得JS18-150株。病毒噬斑结果显示，相比JS18株，JS18-150株在细胞形成的空斑明显更大，表明JS18-150株在鸡胚成纤维细胞上适应性提高。测序结果显示，该毒株传代至第100代时缺失gI基因第269位至US9全部核苷酸，且挑取的单克隆继续传代

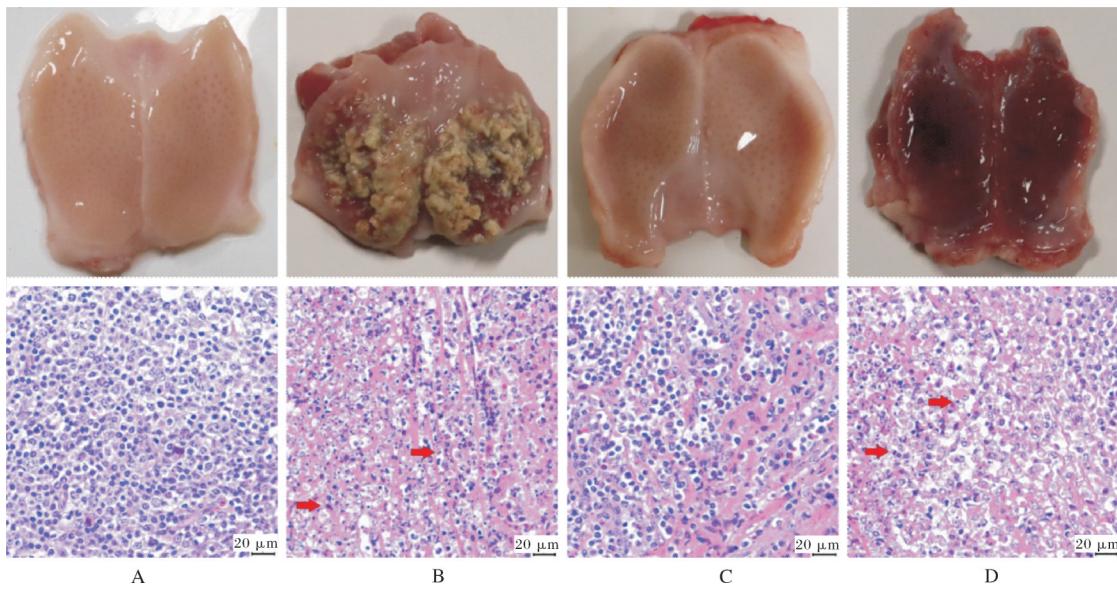


图7 攻毒后扁桃体组织的剖检与镜检结果(400×)

Fig.7 Autopsy and microscopic examination of tonsil tissue after challenge(400×)

至150代时,缺失部分稳定,均未发生改变。一步生长曲线结果显示JS18株和JS18-150株生长动力学相似,即JS18-150株在传代过程中虽发生缺失,但并不影响其增殖能力。安全性试验结果显示JS18株免疫组5/5仔猪出现精神不振、呼吸困难和食欲减退等临床症状,同时4/5仔猪死亡。而JS18-150株免疫组所有仔猪均未观察到任何临床症状,且体温正常,均未超过40.5℃。说明JS18-150株毒力显著下降,对仔猪有良好的安全性。中和抗体检测结果显示,免疫后28 d免疫组PRV中和抗体效价分别为(63.8±5.08)和(54.6±6.65),PRV-150株免疫猪体后刺激机体产生显著得抗体水平。攻毒保护试验结果显示,免疫组能100%抵御JS18株和HBZL05株的攻击,未出现任何临床症状,而攻毒对照组出现典型临床症状,且均5/5死亡。说明JS18-150株作为疫苗接种仔猪能够产生良好的交叉保护。

研究表明,猪伪狂犬病病毒编码的gE/gI蛋白可抑制I型干扰素的产生,有利于自身复制,其中gE蛋白通过降解CBP从而阻碍其与IRF3结合来抑制IFN- β 的产生,gI蛋白通过抑制IRF3的二聚化来抑制IFN- β 的产生^[22]。2017年Lamote等^[23]发现伪狂犬病病毒减毒活疫苗Bartha K61株感染细胞后能显著增强I型干扰素应答,并通过一系列试验最终证明源于gE/gI复合物的缺失,除此之外gE的缺失也会增强pDC中ERK1/2磷酸化,来诱导更多I型干

扰素的产生,从而诱导抗病毒反应的发生。以上研究为进一步研究猪伪狂犬病病毒JS18-150株致弱原因提供了重要参考。

参考文献 References

- [1] 车艳杰,康亚男,吕茂杰,等.猪伪狂犬病病毒变异株(RP02株)3种佐剂灭活疫苗制备及其安全性评价[J].养殖与饲料,2022,21(11):35-39.CHE Y J, KANG Y N, LU M J, et al. Manufacturing and safety evaluation of three adjuvant inactivated vaccines against pseudorabies variant(RP02 strain)[J]. Animal breeding and feed, 2022, 21(11): 35-39 (in Chinese with English abstract).
- [2] YU X, ZHOU Z, HU D, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012[J]. Emerging infectious diseases, 2014, 20(1):102-104.
- [3] BOUMA A. Determination of the effectiveness of pseudorabies marker vaccines in experiments and field trials [J]. Biologicals: journal of the international association of biological standardization, 2005, 33(4):241-245.
- [4] 王亮. 伪狂犬病毒的流行病学和致病机制研究进展[J]. 中国动物保健, 2023, 25(6): 34-35. WANG L. Research progress on epidemiology and pathogenic mechanism of pseudorabies virus[J]. China animal health, 2023, 25(6): 34-35 (in Chinese).
- [5] LICHTENSTEIGER C A, VIMR E R. Systemic and enteric colonization of pigs by a hilA signature-tagged mutant of *Salmonella choleraesuis*[J]. Microbial pathogenesis, 2003, 34(3):149-154.

- [6] 杨毅,李文刚,饶宝,等.猪伪狂犬病疫苗的研究进展[J].江西农业学报,2010,22(3):154-157.YANG Y, LI W G, RAO B, et al. Research advance in swine pseudorabies vaccine [J]. *Acta agriculturae Jiangxi*, 2010, 22 (3) : 154-157 (in Chinese with English abstract).
- [7] BRACK A R, KLUPP B G, GRANZOW H, et al. Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation[J]. *Journal of virology*, 2000, 74(9):4004-4016.
- [8] VAN ZIJL M, WENSVOORT G, DE KLUYVER E, et al. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera[J]. *Journal of virology*, 1991, 65(5):2761-2765.
- [9] 李超,孙道锐.猪伪狂犬病疫苗研究进展[J].山东畜牧兽医,2019,40(7):78-79. LI C, SUN D R. Research progress of porcine pseudorabies vaccine[J]. *Shandong journal of animal science and veterinary medicine*, 2019, 40 (7) : 78-79 (in Chinese).
- [10] 薛爽.猪伪狂犬基因缺失疫苗的研究进展[J].湖南畜牧兽医,2016(4):47-49.XUE S. Research progress of gene deletion vaccine for pseudorabies in pigs[J]. *Hunan journal of animal science & veterinary medicine*, 2016(4):47-49 (in Chinese).
- [11] LOMNICZI B, WATANABE S, BEN-PORAT T, et al. Genome location and identification of functions defective in the Bartha vaccine strain of pseudorabies virus[J]. *Journal of virology*, 1987, 61(3):796-801.
- [12] KIT S, SHEPPARD M, ICHIMURA H, et al. Second-generation pseudorabies virus vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein genes[J]. *American journal of veterinary research*, 1987, 48(5):780-793.
- [13] WANG C H, YUAN J, QIN H Y, et al. A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China [J]. *Vaccine*, 2014, 32(27):3379-3385.
- [14] GU Z, HOU C, SUN H, et al. Emergence of highly virulent pseudorabies virus in Southern China [J]. *Can J vet res*, 2015, 79(3):221-228.
- [15] WU R, BAI C Y, SUN J Z, et al. Emergence of virulent pseudorabies virus infection in Northern China [J]. *Journal of veterinary science*, 2013, 14(3):363-365.
- [16] DELVA J L, NAUWYNCK H J, METTENLEITER T C, et al. The attenuated pseudorabies virus vaccine strain bartha K61: a brief review on the knowledge gathered during 60 years of research [J/OL]. *Pathogens*, 2020, 9 (11) : 897 [2023-10-24].<https://doi.org/10.3390/pathogens9110897>.
- [17] TAN L, YAO J, YANG Y D, et al. Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China[J]. *Virologica sinica*, 2021, 36(4):588-607.
- [18] 张华伟,周明光,侯真真,等.基于CRISPR/Cas9介导的同源重组技术构建TK、gE和gI基因缺失的伪狂犬病病毒[J].华中农业大学学报,2021,40(2):206-212.ZHANG H W, ZHOU M G, HOU Z Z, et al. Constructing pseudorabies viruses with TK, GE, and gI gene deletions based on CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination techniques [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40 (2):206-212 (in Chinese with English abstract).
- [19] 陈斌.伪狂犬病病毒及其免疫研究进展(下)[J].四川畜牧兽医,2001,28(9):27-28. CHEN B. Research progress of pseudorabies virus and its immunity (II)[J]. *Sichuan animal and veterin sciences*, 2001, 28(9):27-28 (in Chinese).
- [20] 初秀.匈牙利防制猪伪狂犬病K/61活毒疫苗株简介[J].吉林畜牧兽医,1986,7(1):35. CHU X. Brief introduction of live vaccine strain K/61 for prevention and treatment of porcine pseudorabies in Hungary[J]. *Jilin animal science and veterinary medicine*, 1986, 7(1):35(in Chinese).
- [21] SUHACI I, 初秀.应用活苗防制猪伪狂犬病[J].湖北畜牧兽医,1982(1):54-55. SUHACI I, CHU X. Live seedlings were used to prevent pig pseudorabies [J]. *Hubei animal husbandry and veterinary medicine*, 1982(1):54-55(in Chinese).
- [22] 陆明青.伪狂犬病毒糖蛋白gE和gI抑制IFN-β产生的机制研究[D].南京:南京农业大学,2019. LU M Q. The Mechanism of pseudorabies virus glycoprotein gE and gI inhibiting IFN-β production[D]. Nanjing:Nanjing Agricultural University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [23] LAMOTE J A S, KESTENS M, VAN WAESBERGHE C, et al. The pseudorabies virus glycoprotein gE/gI complex suppresses type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells[J/OL]. *Journal of virology*, 2017, 91(7):e02276-16 [2023-10-24].<http://doi.org/10.1128/JVI.02276-16>.

Obtaining and identifying a mutated and passage-attenuated strain JS18-150 of porcine pseudorabies virus

HOU Zhenzhen, ZHANG Huawei, HAO Genxi, LUO Xiuxin, SONG Wenbo,
ZHOU Mingguang, CHEN Huanchun, XU Gaoyuan

Wuhan Keqian Biology Co., Ltd., Wuhan 430206, China

Abstract Pseudorabies is an acute infectious disease of pigs, which is caused by the infection of pseudorabies virus(PRV). Pseudorabies is mainly prevented by vaccine, and PRV gene-deleted vaccine is the most widely used and effective. Since 2011, a new outbreak has occurred in many pig farms vaccinated with the Bartha-K61 vaccine and has spread to farms in most parts of the country, causing enormous economic losses to the development of our farms. The study found that the new outbreak was caused by PRV variants and showed that the commercially vaccine did not provide complete protection. Therefore, it is urgent to develop a new and efficient PRV vaccine. The prevalent strain JS18 of porcine pseudorabies virus was passaged with chicken embryo fibroblast (CEF) cells to obtain the attenuated vaccine with good safety and high immunogenicity for mutated strain of porcine pseudorabies virus. JS18-150 strain was obtained. Preliminary studies were conducted on the *in vitro* growth characteristics, safety, and immunogenicity of JS18-150 strain through PCR identification, sequencing, pathogenicity testing, and immunogenicity testing. The results showed that the *gI*, *gE*, and *US9* genes of JS18 strain were deleted and the virulence of JS18-150 strain obtained was weakened after continuous passage on CEF. The adaptability on CEF of JS18-150 strain obtained was significantly improved. The growth kinetics of JS18-150 strain obtained was similar to that of the original JS18 strain. No clinical symptoms were observed in all piglets inoculated with $10^{7.0}$ TCID₅₀ JS18-150 strain obtained, and the rectal temperature did not exceed 40.5 °C. Inoculation with $10^{6.0}$ TCID₅₀ JS18-150 strain obtained effectively protected piglets from the attacks of JS18 strain and HB-ZL05 strain. It is indicated that JS18-150 strain obtained has good safety for piglets and can be used as a candidate strain for the development of attenuated PRV vaccines.

Keywords porcine pseudorabies virus; mutated strain; passage-attenuated; gene deletion; pseudorabies vaccine

(责任编辑:赵琳琳)